



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑳ Akt nzeichen: P 34 19 327.8
㉑ Anmeldetag: 24. 5. 84
㉒ Offenlegungstag: 28. 11. 85

31

DE 34 19327 A 1

㉑ Anmelder:
Flow Laboratories GmbH, 5309 Meckenheim, DE

㉒ Vertreter:
Schönwald, K., Dr.-Ing.; von Kreisler, A.,
Dipl.-Chem.; Fues, J., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Keller,
J., Dipl.-Chem.; Selting, G., Dipl.-Ing.; Werner, H.,
Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw., 5000 Köln

㉓ Erfinder:
Backes, Herbert, Dipl.-Biol., 5309 Meckenheim, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

㉔ Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Wachstums von Bakterien

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Wachstums von aeroben gramnegativen Bakterien in einer Suspension, wobei man die Bakterien mit einem enzymatisch spaltbaren Substrat versetzt und ein Spaltstück des Substrats photometrisch mißt.

DE 34 19327 A 1

VON KREISLER SCHÖNWALD EISHOLD FUES
VON KREISLER KELLER SELTING WERNER

3419327

PATENTANWÄLTE

Dr.-Ing. von Kreisler † 1973
Dr.-Ing. K. W. Eishold † 1981
Dr.-Ing. K. Schönwald
Dr. J. F. Fues
Dipl.-Chem. Alek von Kreisler
Dipl.-Chem. Carola Keller
Dipl.-Ing. G. Selting
Dr. H.-K. Werner

Flow Laboratories GmbH
Mühlgrabenstraße 10

5309 Meckenheim bei Bonn

DEICHMANNHAUS AM HAUPTBAHNHOF
D-5000 KÖLN 1

23. Mai 1984

W/Fi/Lö-618

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Wachstums von aeroben gram-negativen Bakterien in einer Suspension, dadurch gekennzeichnet, daß man die Bakterien mit einem enzymatisch spaltbaren Substrat versetzt und ein Spaltstück des Substrats photometrisch mißt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Substrat L-Alaninparanitroanilid, L-Leucinparanitroanilid oder Prolinparanitroanilid ist und das Spaltprodukt Paranitroanilin gemessen wird.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration des Substrats 0,5 bis 5 mmol/l beträgt.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß bei zwei verschiedenen Wellenlängen gemessen wird, die durch das Spaltstück des Substrats

verschieden absorbiert werden.

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Wellenlängen im Bereich von 380 bis 450 nm liegen.

05

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß die eine Wellenlänge 414 nm und die zweite 450 nm beträgt.

- 10 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 6 zur Erfassung der synergistischen und antagonistischen Wirkung verschiedener Substanzen.

- 15 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Feststellung der Resistenz aerober gram-negativer Bakterien gegen antimikrobiell wirkende Verbindungen.

- 20 9. Verfahren nach Anspruch 8 zur Feststellung der Resistenz aerober gram-negativer Bakterien gegen Antibiotika oder Chemotherapeutika.

25

30

35

Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Wachstums
von Bakterien

05 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Wachstums von aeroben gram-negativen Bakterien in einer Suspension.

10 Die bisher bekannten Verfahren zur Bestimmung des Wachstums von Bakterien beruhen auf der Ermittlung der Zahl oder Masse der Zellen, die im allgemeinen in homogenen Suspensionen der Bakterien in einer Flüssigkeit vorliegen. Hierbei erhält man entweder die Bakterienkonzentration (Zellzahl/ml) oder die Bakteriendichte (mg/ml). Aus der Zunahme dieser Größen in einer
15 wachsenden Bakterienkultur lassen sich die Teilungsrate als Anzahl der Verdopplung der Bakterienkonzentration/h und als ihr reziproker Wert die Generationszeit als Zeitintervall der Verdopplung bestimmen.

20 Das zur Bestimmung der Gesamtzellzahl am weitesten verbreitete Verfahren bedient sich der mikroskopischen Auszählung der in dünner Schicht in einer Zählkammer (z.B. nach Neubauer, Toma oder Petroff-Hauser) ausgebreiteten Zellen. Die Relativzählung zu bekannten Zahlen kleiner Teilchen, z.B. den Erythrocyten des Blutes
25 (ca. 5×10^6 Erythrocyten/ml) gehört zu den ältesten Verfahren. Weiterhin kann die Zählzahl mit elektronischen Zählgeräten bestimmt werden. Diese machen sich den Leitfähigkeitsverlust einer Elektrolytlösung zunutze,
30 der beim Durchtritt eines Bakteriums durch eine enge Öffnung auftritt. Bei Zellzahlen unter 10^6 Zellen/ml läßt sich die Membranfiltermethode anwenden.

35 Die Lebendzellzahl wird üblicherweise nach dem Koch'schen Plattengußverfahren bestimmt. Hierbei wird

ein aliquoter Teil einer in geeigneter Weise verdünnten homogenen Zellsuspension mit flüssigem Nähragar vermengt und in Petrischalen ausgegossen. Die Suspension kann auch auf der Oberfläche mit einem Drigalskyspatel ausgespatelt werden. Die Zellen können aber auch durch
05 Filtration auf einen Filter niedergeschlagen werden, welches anschließend auf Nähragar oder Nährkartonscheiben aufgelegt wird. In allen Fällen werden nach dem Bebrüten die Kolonien gezählt. Die Anwendung des
10 Koch'schen Plattengußverfahrens und abgeleiteter Methoden ist auf die Zählungsart gleicher Zellen aus homogenen Suspensionen abgestellt und läßt sich nicht auf die Zählungsart verschiedener Individuen aus gemischten Populationen übertragen.

15 Die Wahl des zur Ermittlung der Bakterienmasse heranzuziehenden Verfahrens hängt davon ab, in welchem Zusammenhang auf die Bakterienmasse Bezug genommen werden soll. Bei der Bestimmung von Zellerträgen (Ausbeuten)
20 wird häufig das Frischgewicht oder Trockengewicht ermittelt. Als Bezugsgrößen für Stoffwechsel- und Enzymaktivitäten dienen der Protein- oder Stickstoff-Gehalt. Die Zellmasse kann direkt oder indirekt ermittelt werden. Bei ersterer wird das Frisch- und Naßgewicht nach
25 Abzentrifugieren der Zellen bestimmt. Beide Methoden sind mit beträchtlichen systematischen Fehlern behaftet. Erheblich genauer läßt sich der Gesamtstickstoffgehalt (Mikrokjedalverfahren und Mikrodifffusion des Ammoniaks) und der Gesamtkohlenstoffgehalt (nach van-Slike-Folch) zu ermitteln. Routinemäßig wird häufig das
30 Bakterienprotein bestimmt. Modifikationen der Biuret-Methode und andere kolorimetrisch erfaßbare Farbreaktionen leisten gute Dienste. Mikroverfahren sind auf die Messung repräsentativer Proteinbausteine (Tyrosin,
35 Tryptophan) abgestellt (nach Lowry oder Folin-Ciocal-

05 ten). Zu den indirekten Methoden der Biomassebestimmung
zählt die Ermittlung der Trübung einer Zellsuspension.
Im Routinebetrieb wird dabei die optische Dichte einer
Suspension als Extinktion gemessen (Extinktionsmessung,
Turbidimetrie). Für manche Zwecke ist auch die Streu-
lichtmessung (Nephelometrie) genauer. Eine lineare Ab-
hängigkeit zwischen den Meßwerten und der Bakterienmas-
se besteht bei beiden Verfahren jedoch nur im Bereich
10 sehr geringer Zelldichten. Steigende Zelldichten haben
eine rasch abnehmende Genauigkeit zur Folge. Insbeson-
dere die turbidimetrische Messung ist sehr ungenau, da
die Linearität oberhalb einer Extinktion von 0,3 sehr
rasch abnimmt. Beide Verfahren haben zudem den Nach-
teil, daß unspezifische Trübungen und Luftblasen ein
15 Wachstum vortäuschen können, zumal nur bei einer Wel-
lenlänge gearbeitet wird. Ein weiteres Problem der di-
rekten Wachstumsbestimmung besteht darin, daß einige
Bakterienarten in Gegenwart von bestimmten Antibiotika
(z.B. β -Lactam Antibiotika) eine verlängerte lag-Phase
20 aufweisen. Infolgedessen liegen bei geringen Keimein-
saaten die Meßwerte so eng zusammen, daß es schwer
oder sogar unmöglich ist, zu erkennen, ob Wachstum oder
kein Wachstum vorliegt. Eine weitere indirekte Methode
beruht darauf, Stoffwechselgrößen zu messen, die direkt
25 mit dem Wachstum zusammenhängen (O_2 -Aufnahme, Produk-
tion von CO_2 oder Säure) und die daher ein adäquates
Maß für die Mikroorganismenmasse abgeben. Ihre Messung
ist in Fällen angezeigt, in denen andere Methoden ver-
sagen, z.B. bei sehr geringen Zelldichten. Zur Messung
30 können titrimetrische, manometrische und elektroche-
mische Verfahren angewandt werden.

Weitere bekannte Verfahren beziehen sich auf die Hem-
mung des Wachstums durch verschiedene Inhibitoren (z.B.
35 Antibiotika). Zur quantitativen Prüfung der Wirkung

eines Antibiotikums bedient man sich häufig des Plattendiffusionstests. Zur Durchführung dieses Tests werden Schalen mit einem mit der Testkeimsuspension versetzten Nähragar bis zu einer bestimmten Höhe gefüllt.

05 Auf diese Platten werden die Testlösungen aufgebracht, indem sie entweder in ausgestanzte Löcher (Lochplatten-test) oder in aufgesetzte Glas- oder Metallzylinder einpipettiert werden (Zylinderplattenmethode) oder in

10 Filterpapier aufgesogen und als Filterpapierscheiben auf den Agar aufgelegt werden. Bei positiver Reaktion wird nach der Bebrütung eine Hemmzone sichtbar, deren Durchmesser bei Einhaltung konstanter Versuchsbedingungen (Nährbodenzusammensetzung, Schichtdicke, Ein-

15 saatdichte, Bebrütungszeit und -temperatur) dem Logarithmus der Konzentration des Antibiotikums proportional ist. Im Verdünnungsreihentest wird das Antibiotikum in einer mit dem Testkeim beimpften Nährlösung in Verdünnungsstufen 1:2 verdünnt und nach Bebrütung diejenige

20 minimale Konzentration ermittelt, bei der gerade kein Wachstum erfolgt (minimale bakteriostatische Konzentration). Der Test kann im Makro- oder Mikromaßstab durchgeführt werden. Dabei setzt man in verschiedenen Röhrchen oder Vertiefungen einer Mikrotiterplatte verschiedene Konzentrationen eines Antibiotikums ein. Bei

25 einer geeigneten Auswahl der Verdünnungsschritte läßt sich die minimale Hemmkonzentration des Antibiotikums feststellen. Die Testdauer beträgt in der Regel 16 bis 24 Stunden. Der Agardilutionstest wird ähnlich dem Reihenverdünnungstest durchgeführt. Einziger Unterschied ist, daß statt einer flüssigen Suspension feste

30 Nährböden verwendet werden.

Alle diese Verfahren zur Bestimmung des Wachstums bzw. der Wachstumshemmung von Bakterien haben Nachteile. Sie

35 sind nämlich teilweise sehr zeitaufwendig und/oder

führen zu ungenauen Ergebnissen.

Die vorliegende Erfindung hat sich daher die Aufgabe gestellt, ein indirektes Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Wachstums von aeroben gram-negativen Bakterien zu entwickeln, das schnell und genau arbeitet.

Zur Lösung der Aufgabe ist erfindungsgemäß vorgesehen, daß man die Bakterien mit einem enzymatisch-spaltbaren Substrat versetzt und ein Spaltstück des Substrats photometrisch mißt.

Es wurde überraschenderweise gefunden, daß Paranitroanilide als Substrate für aerobe gram-negative Bakterien dienen können und die entstandenen Spaltstücke ein direktes Maß für das Wachstum der Bakterien bilden. Bevorzugt werden L-Leucinparanitroanilid und Prolinparanitroanilid. Besonders bevorzugt wird L-Alaninparanitroanilid.

Aus der DE-PS 26 53 047 sind Testsysteme bekannt, die zum Nachweis gram-negativer Keime über deren Aminopeptidaseaktivität L-Alanin-4-nitroanilid verwenden. Aus J. Clin. Microbiol. 13 (1981) 483-490 ist außerdem bekannt, Naphtylaminderivate für die Identifizierung von Enterobacteriaceen einzusetzen. Zur quantitativen Bestimmung des Bakterienwachstums werden diese Testsysteme jedoch nicht eingesetzt. Außerdem wird davon ausgegangen, daß die Testsysteme nicht für alle gram-negativen Bakterien geeignet ist.

Die Bakterien spalten mit Hilfe des Enzyms Aminopeptidase das Paranitroanilid und setzen Paranitroanilin frei. Das Enzym Aminopeptidase wurde bei verschiedenen

gram-negativen Bakterien von Teuber und Cerny erstmals nachgewiesen (Arch. Mikrobiol. Bd. 91, 235-240 (1973)). Die Aminoendopeptidase wurde von Lazdunski und Mitarbeitern (Eur. J. Biochem. Bd. 60, 349-369 (1975)) beschrieben. Während die Paranitroanilide im Bereich von 380 bis 420 nm in den erfindungsgemäß verwendeten Konzentrationen kaum absorbieren, ändert sich die Lichtabsorption durch die Abspaltung des Paranitroanilins in charakteristischer Weise. Die Zunahme der Absorption pro Zeiteinheit ist ein direktes Maß für die Zu- oder Abnahme des Wachstums der Bakterien. Insbesondere kann das Verfahren aber auch der Erfassung der synergistischen und antagonistischen Wirkung verschiedener Substanzen dienen. Darüberhinaus eignet sich das Verfahren zur Feststellung der Resistenz aerober gram-negativer Bakterien gegen antimikrobiell wirkende Verbindungen oder Wachstumsinhibitoren, insbesondere Antibiotika und Chemotherapeutika. In der mikrobiologischen Labordiagnostik ist dies neben der Identifizierung bakterieller Krankheitserreger ein sehr wichtiger Untersuchungsschritt, um Aussagen über die Therapiemöglichkeiten zu erhalten.

Eigene Untersuchungen haben gezeigt, daß die Nitroanilide in Konzentrationen von 0,5 bis 5 mmol/l keine störende eigene bakteriostatische Wirkung zeigen und deshalb vorzugsweise in diesem Konzentrationsbereich eingesetzt werden sollten.

Die Messung erfolgt bei 2 verschiedenen Wellenlängen, die durch das Spaltstück des Substrats verschieden absorbiert werden. Bevorzugt werden Wellenlängen im Bereich von 380 bis 450 nm. Besonders bevorzugt wird, daß die eine Wellenlänge bei 414 nm und die zweite bei 450 nm liegt. Statt 414 nm kann auch eine andere Wellen-

länge benutzt werden, bei der freies Paranitroanilin absorbiert. Bei mehr als 450 nm absorbiert Paranitroanilin nur noch unwesentlich. Das Zwei-Wellenlängenmeßprinzip hat den großen Vorteil, daß alle auch unspezifischen Trübungswerte abgezogen werden, während bei den sonst in der Mikrobiologie üblichen turbidimetrischen Verfahren (oft fälschlicherweise als photometrische Verfahren bezeichnet) Luftblasen und feste Bestandteile der Nährlösung störend wirken. Die Absorptionen für die durch das Wachstum verursachte Trübung sind bei den beiden verwendeten Wellenlängen etwa gleich. Dadurch wird eine reine photometrische Auswertung ermöglicht. Das hat wiederum den Vorteil, daß die unterschiedlichen Werte für Wachstum und Wachstumshemmung sich deutlich voneinander abheben. Während bei reiner Trübungsmessung innerhalb von 5 Stunden Absorptionen von maximal 0,5 bis 0,6 erreicht werden können, liegen die Werte der erfindungsgemäßen Methode zwischen 1,4 und 2,3 und bei fehlendem bzw. verzögertem Wachstum unterhalb von 0,2.

Für die Beurteilung, ob Wachstum vorliegt oder nicht, wird nach einem speziellen Auswertungsprinzip vorgegangen:

$$\frac{A_{\text{(Kontrolle)}} - A_{\text{(Antibiotikum)}}}{A_{\text{(Kontrolle)}}} = Q$$

Liegt der Quotient Q oberhalb eines Schwellenwertes, kann der Keim nicht wachsen. Unterhalb dieses Schwellenwertes wächst das Bakterium. Die Schwellenwerte sind für die einzelnen Antibiotika unterschiedlich, liegen jedoch im Bereich von 0,85 bis 0,92.

Durch die folgenden Ausführungsbeispiele wird die Erfindung näher erläutert:

B e i s p i e l eI. Materialien:

- 05 1. Mikrotitrationsplatten mit vorgegebenen verschiedenen Antibiotika-Konzentrationen und eine oder mehrere antibiotikafreie Mikrotitrationsplatten. Die Substrate können getrocknet oder gefroren sein.
- 10 2. Sterile Müller-Hinton-Bouillon mit einer Konzentration von 3 mmol/l L-Alaninpara-nitroanilid;
3. Sterile Kochsalzlösung;
- 15 4. McFarland-Standard 0,5 (Trübungsstandard);
5. Pipette;
6. Plattenschüttler für Mikrotitrationsplatten mit oder
20 ohne Inkubatoreinheit;
7. Mikrotitrationsplatten-Photometer (Multiskan MC);
8. An 7. angeschlossene Computereinheit mit Disketten-
25 laufwerk, Monitor und Drucker;
9. Bakterienkulturen auf Agarplatten.

II. Arbeitsweise

- 30 Man stellt eine Suspension mit physiologischer Kochsalzlösung her (entsprechend McFarland-Standard 0,5 10^8 Keime/ml). Herstellung des 0,5 McFarland-Standards:
- 0,5 ml, 0,048 M BaCl_2 (1,175% $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ g/v) und
35 99,5 ml, 0,18 M H_2SO_4 (1% v/v) werden zusammengegeben

und kräftig gemischt. Der Standard kann gut verschlossen in der Dunkelheit mehrere Wochen aufbewahrt werden.

05 100 µl dieser Suspension werden zu 10 ml Müller-Hinton-Bouillon mit 3,0 mmol/l Analinparanitroanilid gegeben (Verdünnungsfaktor 1:100 entspricht ungefähr 10^6 Keime/ml). Mit einer automatischen Pipette gibt man anschließend 50 µl dieser Suspension (oder ein anderes geeignetes Volumen) in die Vertiefungen der Mikrotitrationsplatte und klebt die Platte anschließend mit einer Klebefolie ab. Die Mikrotitrationsplatten werden auf 10 einen Plattenschüttler gegeben und unter Schütteln 5 Stunden bei 35 bis 37°C inkubiert. Die Platten werden danach mit dem Photometer ausgewertet. Die Ergebnisse 15 sind in den folgenden Tabellen zusammengestellt. Dabei wurde mit den in Tabelle 1 angegebenen Antibiotika-Konzentrationen gearbeitet. Die Ergebnisse zeigen, daß die bei An- und Abwesenheit von L-Alaninparanitroanilid gemessenen Absorptionswerte sich deutlich voneinander 20 abheben. Zudem sind die Absorptionswerte der reinen Trübungsmessung laut Tabelle 3 selbst bei 550 nm sehr niedrig und eng beieinanderliegend.

25 Auf der anderen Seite zeigt Tabelle 2 deutliche Abstufungen der Meßwerte bei Zusatz unterschiedlicher Antibiotikamengen. So läßt die Zunahme der Wachstumshemmung auch bei nur geringfügig erhöhten Antibiotika-Konzentrationen sich schon genau messen.

30

35

3419327

- 12 -

T a b e l l e 1

Antibiotika-Konzentrationen (mg/l) der Agarplatten A - H

Agar-Platte	H	G	F	E	D	C	B	A
05								
1. Ampicillin	*	0.5	1	2	4	8	16	32
2. Piperacillin	*	1	2	4	8	16	32	64
3. Mezlocillin	*	1	2	4	8	16	32	64
4. Cefazolin	*	1	2	4	8	16	32	64
10								
5. Cefotaxim	*	0.5	1	2	4	8	16	32
6. Lamoxactam	*	1	2	4	8	16	32	64
7. Cefoxitin	*	0.5	1	2	4	8	16	32
8. Gentamicin	*	0.25	0.5	1	2	4	8	16
9. Amikacin	*	1	2	4	8	16	32	64
15								
10. Doxycyclin	*	0.25	0.5	1	2	4	8	16
11. Fosfomycin	*	4	8	16	32	64	128	256
12. Chlor- amphenicol	*	0.5	1	2	4	8	16	32

20 * Leerwert

25

30

T a b e l l e 2

Absorptionswerte mit L-Analin-Paranitroanilid

	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	<u>0.151</u>	0.805	0.704	0.077	0.059	0.060	0.061	0.058	0.049	0.066	0.059	0.060
B	0.292	0.858	1.009	0.078	0.068	0.064	0.060	0.058	0.059	0.064	0.067	0.055
C	0.406	0.829	0.771	0.089	0.086	0.063	0.065	0.048	0.049	0.061	<u>0.072</u>	0.049
D	0.661	0.788	0.728	0.100	<u>+0.121</u>	<u>+0.078</u>	0.090	0.055	0.054	<u>+0.074</u>	0.369	0.057
E	0.875	0.595	0.677	+0.089	0.285	0.313	<u>+0.103</u>	<u>+0.076</u>	0.060	1.223	1.736	0.055
F	0.966	0.643	0.634	<u>0.175</u>	0.611	0.798	1.350	<u>1.187</u>	<u>+0.055</u>	1.329	1.772	+0.068
G	1.340	0.678	0.602	0.619	0.902	0.927	1.918	1.979	0.279	1.927	1.838	<u>0.162</u>
H	1.868	1.788	1.800	1.794	1.837	1.767	1.872	1.882	1.866	1.991	2.024	1.817

Erläuterungen:

+ = visuell nach 24 h

— = nach 5 h photometrisch

Messung bei 414 nm und 450 nm;

Buchstaben A bis H und Ziffern 1 bis 12 laut Tabelle 1;

Testorganismus: Escherichia coli

T a b e l l e 3

Absorptionswerte ohne L-Alanin-Paranitroanilid (reine Trübungsmessung)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.069	0.079	0.078	0.075	0.077	0.067	0.084	0.094	0.072	0.084	0.078 0.071
B	0.078	0.089	0.091	0.107	0.088	0.075	0.087	0.076	0.086	0.078	0.075 0.082
C	0.076	0.082	0.109	0.086	0.071	0.100	0.078	0.069	0.081	0.078	0.078 0.080
D	0.093	0.088	0.098	0.096	0.078	0.081	0.071	0.091	0.073	0.077	0.093 0.075
E	0.107	0.099	0.094	0.079	0.097	0.095	0.088	0.104	0.081	0.148	0.197 0.072
F	0.093	0.087	0.091	0.070	0.101	0.086	0.105	0.133	0.102	0.123	0.219 0.090
G	0.124	0.107	0.099	0.125	0.097	0.129	0.194	0.167	0.107	0.205	0.248 0.106
H	0.191	0.246	0.229	0.220	0.224	0.238	0.231	0.217	0.183	0.216	0.208 0.166

Erläuterungen:

Buchstaben A bis H und Ziffern 1 bis 12 laut Tabelle 1;

Messung bei 550 nm;

Testorganismus: Escherichia coli